

褐斑病菌に対するフェノール性抗菌物質の 単離と構造解析*

知 地 英 征

藤女子大学 人間生活学部 食品機能学研究室

黒 田 睦

花王石鹼栃木第一研究所

山 田 次 良

藤女子大学 人間生活学部 食品栄養学研究室

ABSTRACT

Isolation and structure elucidation of a phenolic antifungal substance against *Cercospora beticola* Sacc. from seeds of sugar beet (*Beta vulgaris saccharifera* Alefeld). HIDEYUKI CHIJI (Laboratory of Food Biochemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, Faculty of Human Ecology, Fuji Women's College, Ishikari-chô, Hokkaidô 061-32), MUTUMI KURODA (Tochigi Research Laboratories of Kaô Corporation, Tochigi 321-34) and JIRO YAMADA (Laboratory of Food Chemistry, Department of Food Science and Human Nutrition, Faculty of Human Ecology, Fuji Women's College, Ishikari-chô, Hokkaidô 061-32).

An antifungal substance against *Cercospora beticola* Sacc. was isolated from seeds of sugar beet (*Beta vulgaris saccharifera* Alefeld). The structure of the compound was established as methyl protocathechuate (I) on the basis of chemical and spectral data. The antifungal activity of I (200 µg/ml) was 44.8% and 35.0% against the fungi susceptible and resistant to methyl thiophanate, respectively. The activity of I was about five times higher than that of protocathechuic acid and protocathechualdehyde.

緒 言

てん菜（ビート: *Beta vulgaris saccharifera* Alefeld）は、北海道における主要農産物の一つで、砂糖原料用作物である。この作物に発生する病害の中で、被害、発生とも最大の褐斑病は褐斑病菌 (*Cercospora beticola* Sacc.) の感染によって葉茎部に褐色の斑点を生じ、最後に枯らしてしまう植物病である。この褐斑病菌に対する農薬の連続使用は、

薬剤耐性菌を出現し、てん菜栽培農家にとって大きな問題になっている。¹⁾ そこで、我々は、高等植物、特にあかぎ科植物に含まれる天然抗菌物質の検索を行ってきた。^{2, 3)}

前報³⁾では、てん菜種子から単離した8種類のフェノールアルデヒドとフェノールカルボン酸について抗菌活性を調べ、フェノールアルデヒド、とくにシリングアルデヒドが褐斑病菌に対して強い抗菌力を持つことを明らかにした。

*天然抗菌性物質の検索と構造解析 (第3報). Isolation and structural elucidation of natural antibacterial substances (Part III).

本研究では、新たにてん菜種子から褐斑病菌の生育を強く抑制するフェノール性物質を単離したので、その機器分析による構造解析と抗菌力試験の結果について報告する。

実験方法

1. 実験試料と分析方法

(1) 植物試料

てん菜 (*Beta vulgaris saccharifera* Alefeld) の種子はホクレン女満別採種所から譲与されたものを用いた。

(2) クロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーの担体にワコーゲル C-200 (和光純薬) を使用し、溶出溶媒としてベンゼン-酢酸エチル-エタノール系とクロロホルム-エタノール系を用いた。

薄層クロマトグラフィーにはシリカゲル (Kieselgel G Type 60) を用いた。展開溶媒はクロロホルム-エタノール (19:1, v/v) を使用した。

フェノール化合物の検出には、フォーリン-チオカルト試薬の2倍希釈液と塩化第二鉄試薬を用いた。

(3) 機器分析

質量スペクトル (EI-MS)、高分解能質量スペクトル (HR-MS) は北海道大学農学部農芸化学科農薬化学講座に依頼し、核磁気共鳴スペクトル (NMR) は北海道大学理学部 100MHz NMR 管理講座に依頼し、測定した。赤外線吸収スペクトル (IR) は KBr 法で測定した。

2. 化合物の単離方法

前報²⁾で述べたように、てん菜種子のメタノール抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒: ベンゼン-酢酸エチル-エタノール系) で精製した。F1 から F9 の9つの溶出画分に分け、そのうち褐斑病菌に対する抗菌活性の強い F3 (1.536 g) を、さらに、シリカゲルカラム (溶出溶媒: クロロホルム-エタノール系) で精製し、フェノール化合物 (白色結晶, 44.9 mg) を単離した。この化合物の機器分析の結果は欄外**に示した。

フォーリン-チオカルト試薬では、灰青色、塩化第二鉄試薬では、紫青色の呈色反応を示した。

3. てん菜褐斑病菌に対する抗菌活性試験

(1) 供試菌

てん菜褐斑病菌 (*Cercospora beticola* Sacc.) のチオフアナートメチル剤感受性菌および耐性菌を実験に使用した。

(2) 前培養及び使用培地

褐斑病菌の培養にはポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地に 0.2% 酵母エキスを添加し用いた。オートクレーブ 120℃, 15分間滅菌した酵母エキスを添加 PDA 培地を 9 cm のシャーレに無菌的に分注し、平板培地を調製し、それに褐斑病菌を接種し、26℃で10日間培養した。

(3) 抗菌試験

単離した化合物のアセトン溶液 (最終濃度: 25, 50, 100, 200 µg/ml) を PDA 培地 (2 ml) に添加し、攪拌した後、温浴中でアセトンを除き、オートクレーブで滅菌した。この培地を滅菌乾燥済みのシャーレ (径 4 cm) に無菌的に分注し、試験用培地を調製した。また、アセトンのみを PDA 培地に添加し、上記と同様の方法で、シャーレに分注し、対照用培地を調製した。

なお、以前に単離した関連化合物 (プロトカテク酸とプロトカテクアルデヒド) との抗菌活性の比較の場合には、最終濃度 500 µg/ml で行った。

(4) 抗菌力試験

前培養した菌叢を滅菌済みのコルクボーラー (径 3 mm) で打ち抜き、試験用培地及び対照用培地に載せ、26℃で96時間培養した。培養後、試験区及び対照区の菌叢の直径を測定し、次式に従って抗菌力 (菌発育抑制率%) を算出した。

$$\text{抗菌力 (\%)} = 100 - \frac{(\text{試験区菌叢の直径 (cm)} - 0.3) \times 100}{\text{対照区の菌叢の直径 (cm)} - 0.3}$$

結果と考察

ビートの病害の中で、褐斑病は、発生、被害とも最大のものであり、その防除のためチオフアナート

* * mp : 138-139℃ UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ) : 206 (4.08), 219 (4.07), 261 (3.84), 295 (3.64). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3460, (3260, 1690 (C=O), 1605, 1520, 1440, 1400, 1290, 1240, 1180, 1160, 1120, 1090, 980, 910, 905, 880, 820, 775, 760, 635, 585, 535. EI-MS m/z : Found m/z : 168 (M⁺), 137 (base peak), 109, 44. HR-MS: Found m/z : 168.0402, Calcd. for C₈H₈O₄ : 168.0402. NMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{acetone-d}_6}$ ppm: 3.78 (3H, s, -COOCH₃), 6.86 (1H, d, J=8Hz), 7.44 (1H, d, J=8Hz), 7.46 (1H, s), 8.40 (2H, s, exchangeable with D₂O).

メチル剤など多くの農薬が使われてきたが、薬剤耐性菌の出現¹⁾によって、従来の農薬の見直しや、新しい農薬の開発が急がれている。一方、農産物の残留農薬やポストハーベストの問題が持ち上がっており、動物や他の植物に影響の少ない天然農薬や生理活性物質の研究が行われている。著者らもてん菜と同属の植物や野性種植物中に含まれる抗菌性物質やファイトアレキシンの検索を行ってきた。

前報³⁾では、ビート種子から4種のフェノールアルデヒドと4種のフェノールカルボン酸を単離同定し、これらの褐斑病菌に対する抗菌活性を調べた。その結果、チオファネートメチル耐性菌と感受性菌のいずれの場合に対してもフェノールアルデヒドがフェノールカルボン酸より強い抗菌力を示すことを明らかにした。

今回は、カラムクロマトグラフィーで分離した画分のうち、褐斑病菌に対して、強い抗菌活性を示したF3フラクションをさらに精製し、白色結晶のフェノール化合物(I)を単離した。

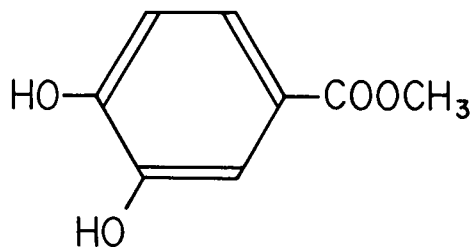
そこで、その機器分析によって、構造解析を行った。EI-MSとHR-MSの分子イオンピークから、分子式を $C_8H_8O_4$ と決定した。フォーリン-チオカルト試薬で灰青色、塩化第二鉄試薬で紫青色を呈することからフェノール化合物と推定された。IRでは、 1690 cm^{-1} にカルボニル基の吸収、 1605 cm^{-1} にベンゼン環の吸収が観察された。NMRでは、 $\delta 3.78$ の3H分のsingletがアセチル基の3個のプロトンに帰属され、 $\delta 8.40$ の2H分のsingletは重水の添加によって消失することから、フェノール性水酸基2個に帰属された。また、EI-MSでは、芳香族メチルエステルに特徴的な M^+-31 (M^+-OCH_3 , m/z 137)と M^+-59 ($M^+-COOCH_3$, m/z 109)のフラグメントイオンが観察された。

これらの結果から、単離した化合物(I)は2個の水酸基を持つ安息香酸(benzoic acid)のメチルエステルと推定された。

EI-MSにおいてカルボニル基と水酸基のオルト効果による M^+-18 (M^+-H_2O)のフラグメントイオンが検出されないことから、ベンゼン環のカルボキシル基に隣接した位置に水酸基はなく、NMRにおいて $\delta 6.86$ (1H, d)の芳香族プロトンの結合定数が8 Hzであることから、3個の芳香族プロトンのうち2個は隣接していることを示している。

以上の、機器分析と呈色反応の結果、この化合物(I)をプロトカテキン酸メチルエステル(methyl

protocatechuate, methyl-3, 4-dihydroxybenzoate)と同定した。



今回単離したプロトカテキン酸メチルエステル(I)と、前報²⁾で単離した抗菌性物質(プロトカテキ酸とプロトカテキアルデヒド)の褐斑病菌に対する抗菌活性を比較した。その結果、Table 1に示したように、添加濃度 $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ において、チオファネート感受性菌と抵抗性菌のいずれに対しても、プロトカテキン酸メチルエステルが他の二つの化合物より著しく強い抗菌活性を示した。

Table 1. Antifungal activity (%) of methyl protocatechuate to *Cercospora beticola*.

Compound ($500\text{ }\mu\text{g/ml}$)	<i>Cercospora beticola</i>	
	Susceptible ¹	Resistant ²
Protocatechu- aldehyde	7.1	26.3
Protocatechuic acid	12.5	4.4
Methyl proto- catechuate	92.4	90.4

¹A strain of *C. beticola* susceptible to methyl thiophanate.

²A strain of *C. beticola* resistant to methyl thiophanate.

このメチルエステル(I)が非常に強い抗菌活性を示したので、添加濃度を低くして調べた。その結果、Table 2に示したように、 $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ で、35%から45%の抗菌力を示した。また $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ では、プロトカテキアルデヒドの $500\text{ }\mu\text{g/ml}$ の添加濃度と同程度の抗菌活性を示し、アルデヒドの約5倍の抗菌力があることがわかった。

フェノールカルボン酸のメチルエステルが、遊離酸やそのアルデヒドより非常に強い抗菌活性を示したことは、このような官能基の導入や化学修飾によって抗菌力を強めることができ、低濃度で強い抗菌活性を持つ化合物を合成できる可能性を示唆している。

Table 2. Antifungal activity (%) of methyl protocatechuate to *Cercospora beticola*.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Cercospora beticola</i>	
	Susceptible ¹	Resistant ²
25	0.8	13.6
50	2.5	10.5
100	10.8	27.3
200	35.0	44.8

¹A strain of *C. beticola* susceptible to methyl thiophanate.

²A strain of *C. beticola* resistant to methyl thiophanate.

この研究中に、てん菜種子からエステル（I）よりさらに抗菌活性の強い化合物が単離されたので、その構造解析と抗菌活性試験を継続中である。

要 約

褐斑病菌（*Cercospora beticola* Sacc.）に対する

抗菌性物質をてん菜（*Beta vulgaris saccharifera* Alefeld）の種子から単離した。その構造は化学的およびスペクトル分析によってメチルプロトカテキン酸（I）と決定された。

I はメチルチオファネート剤に感受性および抵抗性の褐斑病菌に対し、200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、それぞれ44.8%と35.0%の抗菌活性を示し、プロトカテキン酸やプロトカテキナルデヒドよりも約5倍強い抗菌力を持っていた。

謝 辞

本実験に使用した褐斑病菌を分譲して頂いた北海道大学農学部生物機能化学科の富田房男教授に感謝致します。

なお、本研究の一部は藤女子大学・藤女子短期大学特別研究助成金によって行われたものである。

文 献

- 1) 山口武夫・杉本利哉・菅田盾彦・坪木和男：てん菜研究会報，(17)，71-79 (1975)。
- 2) Chiji, H., Arakawa, Y., Ueda, S., Kuroda, M. and Izawa, M. : Phytochemistry, 25, 281-282 (1986)。
- 3) 知地英征・黒田睦・山田次良：藤女子大学・藤女子短期大学紀要，(28)，II，7-10 (1990)。